

• 方药研究 •

右归丸对“劳倦过度、房室不节”肾阳虚小鼠脑基因芯片的影响

杨裕华^{1,2} 李 震²

(1. 山东省疾病预防控制中心, 济南市经十路 72 号, 250014; 2. 山东中医药大学)

[摘要] **目的** 研究右归丸对“劳倦过度、房室不节”肾阳虚小鼠模型脑基因的影响, 以期从基因水平上研究其药物作用机理。**方法** 对照组、模型组和治疗组雄性小鼠各为 10 只、15 只和 10 只。对照组和模型组每日每只灌胃蒸馏水 0.5ml, 治疗组每日每只予右归丸混悬液 0.5ml, 模型组和治疗组雌雄鼠比例 1:6 同笼喂养且雄鼠每日游泳 30~40 分钟共 4 周, 以诱导产生“劳倦过度、房室不节”肾阳虚证。用 ³⁶K 鼠脑芯片检测 3 组鼠脑基因, 并各以二者荧光信号相对强度比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 筛选差异显著基因。**结果** 模型组/对照组共筛选出 186 个差异表达基因, 其中上调基因 150 个, 下调基因 36 个。治疗组/模型组筛选出 155 个差异表达基因, 其中上调基因 64 个, 下调基因 91 个。模型组/对照上调而治疗组/模型组下调的基因有 32 个, 主要是炎症/免疫、神经传递/信号转导等基因。模型组/对照下调而治疗组/模型组上调的基因有 12 个, 主要是与黑色素、孤儿核受体相关的基因。**结论** 右归丸可使肾阳虚小鼠模型显著下调的黑色素显著上调, 改善与孤儿核受体有关激素的作用并促进细胞增殖。

[关键词] DNA 芯片; 肾阳虚; 动物模型; 小鼠; 右归丸

Effect of Yougui Pill on Cerebral Gene Chip of Mice with Kidney-yang Asthenia Induced by Excessive Physical and Sexual Activity
YANG Yu-hua^{1,2}, LI Zhen²

(1. Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the functional mechanism of Yougui Pill (Right Restoring Pill) through its effect on cerebral gene of mice models with kidney-yang asthenia caused by excessive physical and sexual activity. **Methods** There were 10, 15, 10 male mice in the control, model and treatment groups respectively. The control and model groups were treated with 0.5ml per mouse per day distilled water by gavage while the treatment group was given 0.5ml per mouse per day suspension of Yougui Pill. In the model and treatment groups, the ratio of male and female was 1:6, feeding in the same cage, and the males were swimming everyday for 30~40 minutes, 4 weeks in succession, to induce the kidney-yang asthenia. The ³⁶K mouse cerebral gene chips were used to measure the brain genes of mice of 3 groups. The intensity ratio of fluorescence signals ≥ 2 and ≤ 0.5 were used as the scale to screen out the remarkably different genes. **Results** In the model and control groups, totally 186 gene with different expressions were screened out, including the 150 up-regulated genes and 36 down-regulated genes. In the treatment and model groups, 155 gene with different expressions were screened out, including the up-regulated 64 genes and 91 down-regulated genes. There were 32 genes up-regulated in the model and control groups but down-regulated in the treatment and model groups, mainly involving the inflammation per immunity and neurotransmissions persignal transduction genes. There were 12 genes down-regulated in the model and control groups but up-regulated in the treatment and model group, mainly involving the hormone related genes of melanin and orphan nuclear receptor. **Conclusion** Yougui Pill may make the notably down-regulated genes of melanin markedly up-regulated in mice models of kidney-yang asthenia, improving the effect of hormone related orphan nuclear receptor and promoting the cellular proliferation.

Key Words DNA chip; Kidney-yang asthenia; Animal model; Mouse; Yougui Pill (Right Restoring Pill)

证候实质研究是中医现代研究的重要课题。现代研究认为肾阳虚是下丘脑-垂体-靶腺(肾上腺、甲状腺、性腺及胸腺)轴的改变, 并且下丘脑(或下丘脑以上)为其调节中枢。本研究应用诱导劳倦过度、房室不节建立肾阳虚小鼠模型, 并探讨右归丸对这种小鼠模型的影响, 以期从基因水平上揭示其药物作用机理。

1 材料

1.1 动物

SPF 级昆明种健康小白鼠, 雄鼠体重 35~40g, 雌

鼠体重 28~35g, 由山东中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(鲁) 20050015。普通饲料由山东中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物

右归丸由山东中医药大学中医专家门诊部药房提供。处方: 熟地黄 240g, 附子 60g, 肉桂 60g, 山药 120g, 山茱萸 90g, 菟丝子 120g, 鹿角胶 120g, 枸杞子 120g, 当归 90g, 杜仲 120g, 炼蜜和丸, 每丸重 9g(药材重与蜜和辅料重为 1:1)。戊酸雌二醇(法国 Schering SA 生产, 批号: 037B-2)。

1.3 芯片

36K 小鼠基因组芯片,该芯片共有约 35852 条 70 mer 长度的 Oligo DNA,来自于 Operon 公司的小鼠全基因组 Oligo 库,小鼠基因组 4.0 芯片版,共代表了约 25000 个基因,38000 个转录本。购自北京博奥生物有限公司,芯片编号:polymerslide-A-20061228-2-18 和 polymerslide-A-20061228-2-19。

2 方法

2.1 动物造模及分组

参照文献[1]方法造模。正常对照组(对照组):取上述雄性小白鼠 10 只,常规饲养,每日每只灌胃蒸馏水 0.5ml。

劳倦过度加房室不节组(模型组):取上述雄性小白鼠 15 只,每天下午游泳 1 次,每次 30~40 分钟,以 45cm×28cm×30cm 长方形塑料水槽,水深 25cm,水温 28~30℃,供雄性小白鼠游泳。于塑料水槽内强迫小鼠游泳至无力而下沉时捞出,以诱导劳倦过度,每只雄鼠与 6 只动情期雌鼠同笼(动情期雌鼠的准备:每天灌胃戊酸雌二醇混悬液 0.5ml,以阴道涂片检查角化细胞证实之),注意每天更换动情期雌鼠以诱导房室不节,每日每只灌胃蒸馏水 0.5ml。

右归丸治疗组(治疗组):取上述雄性小白鼠 10 只,造模方法同模型组,同时每日每只灌胃右归丸混悬液 0.5ml。以成人 2 丸/日的剂量,将 2 丸溶入 58ml 溶液中,按小白鼠体重计算得每日每只 0.5ml,含药 0.0842g,即 2340mg·kg⁻¹·d⁻¹[2]。试验共进行 4 周。

2.2 脑组织总 RNA 提取

将对照组、模型组及治疗组于观察期 4 周后,按 Trizol 一步法[3]提取脑组织细胞中的总 RNA(同组两只鼠脑混合),通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒(德国)对总 RNA 进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

2.3 对样品 RNA 进行荧光标记[4]

所用 36K 小鼠基因组芯片上的样品包括小鼠的 4 个看家基因作为阳性对照,Hex 作为点样阳性对照,点样溶液 50%DMSO 作为阴性对照。

2.3.1 双链 cDNA 合成纯化 5μg 总 RNA,以 T7-Oligo(dT)(5'-AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC TTT TTT TTT TTT TTT TV-3, V 可以是 G、C 和 A,上海博亚生物技术有限公司)为引物,用 cDNA Synthesis Kit(美国)合成双链 cDNA;双链合成后用 PCR NucleoSpin Extract II Kit(美国)纯化。

2.3.2 体外转录合成 cRNA 用 T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System(美国)将双链 cDNA 进行体外转录合成 cRNA;然后用 RNA Clean-up Kit 纯化。

2.3.3 随机引物反转录 取 2μg cRNA,用 M-MLV 反转录酶,200U/μl,9 Random Primer 进行反转录,反转录产物用 PCR NucleoSpin Extract II Kit 纯化。

2.3.4 cDNA 用 KLENOW 酶标记 取 2μg cRNA 反转录产物,以 9 Random Primer 为引物进行 KLENOW 酶(日本)标记,标记产物用 PCR NucleoSpin Extract II Kit 纯化,纯化后抽干。标记过程中 dATP、dGTP、dTTP 终浓度为 120μM, dCTP 终浓度为 60μM, Cy5-dCTP、Cy3-dCTP 终浓度为 40μM。Cy5-dCTP、Cy3-dCTP(A 美国);dNTP, 10mM each(上海英骏生物技术有限公司);Random Primer, 9mer(上海英骏生物技术有限公司)。共用芯片 2 张,模型组/对照组用 1 张基因芯片,分别以 Cy3 标记对照组样品,以 Cy5 标记模型组样品;治疗组/模型组用 1 张芯片,以 Cy3 标记模型组样品,以 Cy5 标记治疗组样品。

2.4 杂交与清洗

标记的 DNA 溶于 30μl 杂交液中[3×SSC(氯化钠柠檬酸钠缓冲液), 0.2%SDS(十二烷基硫酸钠), 5×Denhart's(德哈特氏溶液), 25%甲酰胺],于 42℃杂交过夜。杂交结束后,先在 42℃左右含 0.2% SDS, 2×SSC 的液体中洗 5 分钟,而后在 0.2×SSC 中室温洗 5 分钟。玻片甩干后即可用于扫描。

2.5 芯片图像的采集与数据分析

芯片用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪(CapitalBio 公司)进行扫描。采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件(Axon Instruments 公司)对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据用 Lowess 方法[5]进行归一化;最后以差异为两倍的标准来确定差异表达基因,亦即荧光信号相对强度比值≥2 和≤0.5 筛选差异显著基因。

3 结果

3.1 动物的一般状态

对照组:活动正常,皮毛光泽,反应灵活。模型组:随着时间延长,动物逐渐出现萎靡不振,畏寒怕冷,拱背少动,反应迟钝,拥挤在一起,饮食减少,皮毛无光泽,竖毛现象明显,腹部皮毛潮湿等肾阳虚表现。治疗组:随着时间延长,动物未出现明显的萎靡不振、畏寒及竖毛等上述肾阳虚表现。

3.2 差异表达基因分析

3.2.1 模型组差异表达基因 以 36K 鼠脑芯片检测

表 1 模型组上调差异表达基因的前 10 位基因

基因符号	比值	基因编号
Igk-C	72.4285	BY742167
Krt2-16	46.2092	NM-008474
UR2-Mouse	40.0460	NM-011910
Dnase113	39.3344	NM-007870
Igk-C	23.4759	XM-132633
Slc25a2	16.0566	XM-111757
Smoc1	13.3288	NM-022316
NPM2-MOUSE	10.4923	NM-181345
E2f7	9.3951	NM-178609
H2-Q8	9.2581	AK017289

表 2 模型组下调差异表达基因的前 10 位基因

基因符号	比值	基因编号
Cga	0.0182	NM-009889
Prl	0.0228	NM-011164
Gh	0.0306	NM-008117
OREX-MOUSE	0.0383	NM-010410
MLCH-MOUSE	0.0409	AK020723
Plpi	0.0571	XM-025896
Q8C0J4	0.0870	XM-125861
Gng12	0.1780	XM-025278
Tmem10	0.2002	XM-153520
Cap1	0.2639	XM-007598

表 3 治疗组上调差异表达基因的前 10 位基因

基因符号	比值	基因编号
Q8C0J4	5.0578	XM-125861
Gng12	4.8350	NM-025278
Epb4.111	4.7142	NM-001003
Kcnj9	4.0301	AK033970
MLCH-MOUSE	3.8534	AK020723
Gamt	3.1350	NM-010255
Dlgap4	3.0786	BB195284
Tmem10	3.0589	NM-153520
Wbp2	2.9736	NM-016852
CTXN-MOUSE	2.8419	NM-183315

表 4 治疗组下调差异表达基因的前 10 位基因

基因符号	比值	基因编号
Gh	0.1479	NM-008117
Lcn2	0.1506	NM-008491
Scgb3a1	0.1667	NM-054037
Q80X76	0.1837	XM-138237
Sult1a1	0.1882	AK002700
Agxt211	0.2326	NM-27907
Ppih	0.2603	AK008394
Sgk	0.2999	NM-011361
Cp	0.3052	AK043248
Steap	0.3183	NM-027399

个,其中上调基因 150 个,已知基因 71 个,下调基因 36 个,已知基因 27 个。在已知基因中,其上、下调基因前 10 位基因见表 1。上调基因涉及神经传递/信号转导、炎症/免疫反应、转录/翻译、代谢、离子通道、细胞结构、凝血机制和精子发育及代谢,下调基因涉及激素、神经传递/信号传导、代谢、转录/翻译、炎症、免疫反应、细胞周期和细胞结构。

3.2.2 治疗组差异表达基因 以 36K 鼠脑芯片检测治疗组/模型组鼠脑表达基因,筛选出差异常表达基因 155 个,其中上调基因 64 个,已知基因 46 个;下调基因 91 个,已知基因 48 个。在已知基因中,其上、下调基因前 10 位基因见表 2。上调基因主要涉及黑色素、神经传递/信号转导、转录/翻译、代谢、离子通道、细胞周期及细胞结构。下调基因主要有转录/翻译、炎症/免疫、神经传递/信号转导、氧化还原、代谢及酪氨酸生成多巴的限速酶。

3.2.3 治疗组与模型组差异表达基因的比较

表 5 模型组基因上调而治疗组基因下调的变化较大的 10 个基因

基因符号	比值 1 *	比值 2 **	倍数 ***	基因编号
Scgb3a1	5.6758	0.1667	34.05119	NM-054037
Q80X76	6.0881	0.1837	33.14573	XM_138237
Sult1a1	4.3258	0.1882	22.9892	AK002700
Sgk	3.1685	0.2999	10.56387	NM-011361
Agxt211	2.2415	0.2326	9.6369	NM-027907
Cp	2.5405	0.3052	8.32525	AK043248
Ly6f	3.2041	0.4144	7.71128	AK129115
Lrrc8	2.6108	0.3771	6.9225	NM-177725
Ly6a	2.6896	0.4442	6.05481	NM-010738
Dfy	2.7788	0.4836	5.74574	NM-010045

表 6 模型组基因下调而治疗组基因上调的基因

基因符号	比值 1 *	比值 2 **	倍数 ***	基因编号
MLCH-MOUSE	0.0409	3.8534	94.1014	AK020723
Q8C0J4	0.0870	5.0578	58.1201	XM-125861
Gng12	0.1780	4.8350	27.1564	NM-025278
Tmem10	0.2002	3.0589	15.2775	NM-153520
Prss18	0.3124	2.4231	7.7559	NM-011177
Gamt	0.4280	3.1350	7.3247	NM-010255
Nr4a1	0.3392	2.2121	6.522	NM-010444
Peskl1n	0.4346	2.7544	6.3381	NM-013892
Fabp7	0.3966	2.1885	5.5189	NM-021272
Hnrpd1	0.4976	2.1347	4.2900	NM-01669

* 为模型组/对照组的比值; ** 为治疗组/模型组的比值; *** 为上调基因是下调基因的倍数

治疗组基因下调而模型组基因上调的共有 32 个基因,其中已知基因 19 个,未知基因 13 个,主要是炎症/免疫、神经传递/信号转导、转录/翻译和代谢,二者

比较变化较大的前 10 位基因见表 3; 治疗组基因上调而模型组基因下调的共有 12 个基因, 其中已知基因 11 个, 未知基因 1 个, 最主要的是黑色素和调节细胞周期的基因上调, 二者比较变化较大的前 10 位基因见表 4。

4 讨论

本研究模型组脂肪酸结合蛋白(FABP)及脑脂肪酸结合蛋白(B-FABP)基因显著下调, 而治疗组该基因显著上调了 4.5 倍。FABP 可与长链脂肪酸及其辅酶 A (CoA) 衍生物有高的亲和力, 主要维持细胞膜磷脂结构的完整性。现已证明, 脂肪酸对 FABP 基因表达有诱导作用。运动性小鼠脑组织 B-FABP 基因表达的明显下调可能与游离脂肪酸的大量消耗, 导致脂肪酸诱导 B-FABP 基因表达作用减弱有关。疲劳性运动对细胞膜结构和功能的损伤, 可能使运动小鼠脑细胞膜损伤得不到修复, 从而加速疲劳。B-FABP 与二十二碳六烯酸(DHA)结合力最强, 为最佳配体。脑突触体膜中富集 DHA, 可促进神经网络的形成, 改善脑血管功能, 并可修复损伤的脑细胞。由于疲劳使鼠脑组织 B-FABP 基因下调, 可能影响 B-FABP 与 DHA 的结合及其转运。由此导致中枢神经系统的功能紊乱及疲劳, 这与本研究模型的“劳倦过度”相一致。加之模型小鼠下丘泌素基因(OREX-MOUSE)下调, 而下丘泌素在小鼠唤醒中发挥重要作用, 该基因下调会导致小鼠困倦, 这与模型小鼠表现的倦怠、困倦相一致。

肾阳虚小鼠模型原黑色素前体基因和反义 RNA 重叠黑色素蛋白基因显著下调, 说明机体抵御寒冷的能力下降, 而机体是通过增加下丘脑分泌黑色素, 从而使暴露于寒冷下的机体提高其产热的利用率, 增加御寒能力, 而治疗组通过显著上调这两个基因来调节并增强其御寒能力。右归丸还可显著下调模型小鼠上调的酪氨酸 3-羟化酶基因(TY^{3H} MOUSE), 该酶是酪氨酸生成多巴及进一步生成儿茶酚胺、黑色素的限速酶, 其受终产物的反馈调节, 显著下调其基因说明多巴、儿茶酚胺和黑色素的生成较多, 机体儿茶酚胺和黑色素水平较高, 此有助于提高御寒能力。因而治疗

组小鼠未出现模型组小鼠的畏寒、怕冷和蜷缩在一起的表现。而本研究肾阳虚小鼠模型生长激素(GH)和催乳素(PRL)显著下调, 加之糖蛋白激素和下丘泌素下调, 还有腺苷酰环化酶相关蛋白 1(CAP1)和泛素-细胞色素 C 还原酶复合物核心蛋白 1(Uqcrc1)下调, 提示模型小鼠氧化磷酸化不活跃, 肾阳虚小鼠模型处在全身功能低下和代谢低下的状态。而治疗组孤儿核受体(一类蛋白转录因子)显著上调, 说明右归丸用药后还具有增强机体内其他激素作用的能力。

SUMO 化(Zfhx1a)及鸟苷酸结合蛋白(Gng12)等调控细胞周期的基因下调都可促进细胞凋亡, 而细胞色素 P450、主要组织相容性复合体(MHC) I-样白细胞 1 及与炎症有关的溶细胞性相关抗原 2-β 蛋白前体(Ctla2b)等上调, 以及有关 GH、PRL 和糖蛋白激素基因的下调都与衰老有关, 也与中医生理性肾阳虚相一致。而治疗组可显著上调鸟苷酸结合蛋白, 从而促进细胞增殖, 减少细胞凋亡。还有与精子发育代谢有关的三个基因上调, 也说明了其与肾主生殖功能有关。

参考文献

- [1] 李震, 贾素菊, 王华云, 等. 应用诱导劳倦过度、房室不节法建立肾阳虚模型的研究. 山东中医学院学报, 1994, 18(6): 418~419.
- [2] 陈奇主编. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 1103.
- [3] Jelinsky SA, Harris HA, Brown EI, et al. Global transcription profiling of estrogen activity: estrogen receptor α regulates gene expression in the kidney. Endocrinology. 2003, 144(2): 701~710.
- [4] 韩金祥编译. DNA 芯片实验操作指南. 济南: 山东大学出版社, 2001: 194~196.
- [5] 李瑶主编. 基因芯片数据分析与处理. 北京: 化学工业出版社, 2006: 109~110.

(收稿日期: 2007-10-08; 修回日期: 2008-01-18)

[编辑: 崔京艳]

(上接第 923 页)

病例分别为 95.23% 和 100%, 说明“血瘀”已成为 COPD 中、重度患者的主要证候要素之一, 因虚致瘀是 COPD 血瘀证形成的主要病机, 其正气虚损以肺、脾、肾气虚为主要因素。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2002 年修订版). 中华结核和呼吸杂志,

2002, 30(8): 453~460.

- [2] 郑筱蓓. 中药新药临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 363~390.
- [3] 王永炎, 李明富, 戴锡孟. 中医内科学. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 54~75.
- [4] 徐升, 韩明向. 慢性阻塞性肺疾病中医药研究进展. 安徽中医学院学报, 2003, 22(6): 61~64.

(收稿日期: 2008-02-26; 修回日期: 2008-04-24)

[编辑: 邓媛]